PCT/DE 2UU4/002503

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

# PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



RECEIVED

0.6 JAN 2005

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 53 175.0

**Anmeldetag:** 

14. November 2003

Anmelder/Inhaber:

Professor Dr. Heinz Vollmers,

97084 Würzburg/DE;

Professor Dr. Hans Konrad Müller - Hermelink,

97084 Würzburg/DE

Bezeichnung:

Humaner monoklonaler Antikörper mit fettsenkender

Wirkung

IPC:

C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Dezember 2004

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

Faust



#### **Zusammenfassung**

5

Aufgereinigtes Polypeptid, dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:3, wobei das Polypeptid low density lipoproteins (LDL), insbesondere LDL-Cholesterin, bindet und im menschlichen oder tierischen Organismus eine fettsenkende Wirkung hat. Die Erfindung beinhaltet die Verwendung des Polypeptides in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fettsenkender Wirkung.

# Humaner monoklonaler Antikörper mit fettsenkender Wirkung

Die Erfindung betrifft ein aufgereinigtes Polypeptid (SAM-6.10) sowie dessen Verwendung in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fettsenkender Wirkung.

#### Hintergrund der Erfindung

Bei einem an Überangebot an Cholesterin (Hyperlipoproteinämie) im Körper kommt es zur Verkalkung (arteriosklerotische Plaque) der Innenschichten der Gefäße und zu einer langsam fortschreitenden Verhärtung und Verdickung der Arterienwände. Im Extremfall droht ein Verschluss des Gefäßes oder beim Aufbrechen der Plaque Thrombusbildung. Die Arteriosklerose ist mit ihren Folgeerkrankungen (koronare Herzkrankheiten, Herzinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheiten, Schlaganfall) noch immer die häufigste Todesursache in der westlichen Welt, Weit über die Hälfte aller für die medizinische Betreuung zur Verfügung stehenden fianziellen Mittel werden schätzungsweise für die Folgen der Arteriosklerose ausgegeben. Um die Ursachen der Arteriosklerose zu erklären, wurden verschiedene Theorien entwickelt, wobei die Lipidtheorie die meistbeachtetste ist.

Allgemein läßt sich sagen: Je höher der LDL-Cholesteringehalt im Blut, desto höher das Risiko, an einer Gefäßverkalkung beispielsweise mit der Folge eines Herzinfarktes zu erkranken. Übergewicht und Hypercholesterinämie sind mit die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose.

. 10

15

20

1.2

## Definitionen und Begriffe

Fette, wie z. B. Cholesterin, sind weder in Wasser noch in Blutflüssigkeit löslich. Um sie trotzdem in einzelne Körperregionen transportieren zu können, werden die Fette, sobald sie sich im Blut befinden, an bestimmte Eiweißkörper (Proteine) gebunden. Diese Verbindungen aus Lipiden (Fetten) und Proteinen (Eiweißen) werden als Lipoproteine bezeichnet.

Die "Lipoproteine" des Plasmas sind hochmolekulare wasserlösliche Komplexe, die aus Lipiden (Cholesterin, Triglyceride, Phospolipide) und Apolipoproteinen bestehen. Das cholesterinhaltige Lipoprotein LDL-Cholesterin verursacht Arteriosklerose und wird auch das "böse" Cholesterin genannt.

"Cholesterin" wird im Körper ubiquitär synthetisiert und ist ein wesentlicher Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen. Im Gegensatz zu den ebenfalls endogen synthetisierten Triglyceriden und Phospholipiden kann der Sterolring des Cholesterinmoleküls nicht mehr abgebaut werden; Cholesterin wird in der Leber zu Gallensäure umgewandelt oder unverändert über die Galle in den Darm ausgeschieden.

Im Plasma liegt Cholesterin zu 25-40% als freies (unverestertes)
Cholesterin und zu 60-75% mit ungesättigten Fettsäuren verestert
vor. Beide Formen zusammen werden als Gesamtcholesterin bezeichnet. Wegen\_seiner geringen-Wasserlöslichkeit wird Cholesterin
im Plasma als Komplex mit Apolipoproteinen transportiert. Im Blut
werden etwa 70 Prozent des Gesamt-Cholesterins mit Hilfe von LowDensity-Lipoproteinen (LDL) transportiert.

10

15

20

"Triglyceride" sind Ester von Glycerin mit drei Fettsäureresten. Analog zum Cholesterin werden auch die Triglyceride im Plasma aufgrund ihrer schweren Löslichkeit an Apolipoproteine gebunden transportiert.

5

"Lipoproteine" werden in der Leber oder im Darm synthetisiert und transportieren im Blut fettlösliche Substanzen wie das Cholesterin.

10

15

20

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihrer Dichte, man unterscheidet die fünf Dichteklassen: Chylomikronen, very low density lipoproteines (VDL), low density lipoproteines (LDL) und high density lipoproteines (HDL). Die Chylomikronen, deren physiologische Konzentration im Nüchternserum im Gegensatz zu jenen der anderen Lipoproteine sehr gering ist, sind Transportvehikel für exogene Glyceride. Die physiologische Verteilung der anderen Lipoproteine ist wie folgt: VLDL 10 %, LDL 70 % und HDL 20 %. VLDL sind die Vorläufer der LDL und Vehikel für den Transport von endogenen Glyceriden. LDL entstehen durch die Hydrolyse der VLDL. LDL und HDL sind beides Regulatoren der zellulären Cholesterinhomöostase, wobei HDL außerdem die Lipolyse (Spaltung von Triglyzeriden in Glyzerin und die freien Fettsäuren) regulieren. LDL haben einen Durchmesser von ca. 20 nm. HDL sind die kleinsten (7-10 nm) und eiweißreichsten Lipoproteinen.

25

"Apolipoproteine" sind ein Bestandteil der Lipoproteine und umgeben, zusammen mit polaren Lipiden, als eine Art äußere Schale den aus hydrophoben Lipiden aufgebauten Lipoprotein-Kern. Mit Ausnahme von LDL, welches nur Apoprotein B enthält, weisen die einzelnen Lipoproteinklassen mehrere strukturell verschiedene Apolipoproteinklassen auf.

#### Lipoprotein-Transport

Cholesterin wird hauptsächlich durch die beiden Lipoproteinklassen LDL und HDL transportiert. LDL sind vor allem zuständig für den Chlosterintransport zu peripheren Zellen, die spezifische Rezeptoren für die LDL besitzen. Die HDL ermöglichen und beschleunigen den Abtransport von Cholesterin aus den extrahepatischen Zellen und Gefäßwänden und führen es der Leber zu.

Hinsichtlich der Pathogenität bei Lipidstoffwechselstörungen läßt sich allgemein sagen, dass LDL-Cholesterinerhöhungen in Verbindung mit HDL-Cholesterinverminderungen die ausgeprägteste Risikoerhöhung für Arteriosklerose darstellen. In der Pathogenese spielen LDL, deren Partikel wesentlich zur Bildung atherosklerotischer Plaques beitragen, und HDL daher eine gegensätzliche Rolle. Für die Beurteilung des Infarktrisikos sind die Quotienten aus Gesamtcholesterin/HDL-Cholesterin und insbesondere LDL-Cholesterin/HDL-Cholesterin entscheident. (Auf die schützende Wirkung des HDL-Cholesterins weisen auch epidemiologische Studien (Framingham-Studie) hin.) Die Folgeerkrankungen der Arteriosklerose beinhalten neben der koronaren Herzkrankheit und peripheren arteriellen Verschlußkrankheiten insbesondere Infarkte in Herz und Gehirn (Schlaganfall).

Der "Scavenger-Pathway" ist ein bekanntes Modell zur Erklärung der Aufnahme von Partikeln durch Zellen. Die Aufnahme fester Partikel (Gewebstrümmer, Fremdkörper, Bakterien oder LDL-Plaques) in das Zellinnere von Phagozyten mit nachfolgendem intrazellulären Abbau erfolgt durch Phagozytose. Die zu Phagozytose befähigten Zellen werden auch als Fresszellen bezeichnet und bestehen überwiegend aus Gewebsmakrophagen sowie aus mobilen Blutmonozyten.

10

15

20

25

Bei der "Phagozytose" kommt es nach Anlagerung der Partikel an die Zellmembranen der Phagozyten durch Bindung an membranständige Fc- und Komplementrezeptoren zur Aktivierung kontraktiler Strukturen innerhalb des Zytoplasmas. Durch lokale Einstülpungen der Zellmembranen kommt es zum Einschluss der Partikel in Zytoplasmavakuolen.

Die sog. Abräum-(Scavenger-)Phagozyten findet man im Lymphknoten in und entlang der zur Medulla (Mark) gehörenden Faserstränge. Während der Lymphpassage vom afferenten zum efferenten Ende des Lymphknotens werden partikuläre Antigene durch die zur Phagozytose befähigten Zellen entfernt.

Darüberhinaus ist bekannt, dass die Adhärenz an phagozytierende Zellen, wie polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen, durch die Anhaftung von Immunoglobulinen (Ig) an die Oberfläche von Bakterien (und anderen Antigenen) vergrößert ist. Es wird vermutet, dass die gesteigerte Adhärenz durch Anlagerung des Fc-Anteils des Immunoglobulins an die Fc-Rezeptoren der Phagozyten bewirkt wird. Nach dem "Schmackhaftmachen der Antigene durch Anhaftung von (od Bindung von) Antikörpern" wird der Komplex aus Antigen und Antikörpern von den phagozytierenden Zellen schneller aufgenommen und verdaut. Die Beschichtung der Antikörperoberfläche mit Immunoglobulinen wird auch als opsonin-bedingte (Fc) Adhärenz bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr.

Die an die Oberfläche von Bakterienzellen bindenden Antikörper sind in der Lage, bestimmte Komponenten der extrazellulären Flüssig-keiten zu fixieren. Im Überbegriff werden diese Komponenten als "Komplement" bezeichnet. Tierversuche zeigten, dass die Phagozytose von mit Antikörpern beschichteten Zellen bei jenen Tieren mit

10

IJ

20

25

Komplementmangel verzögert ist. Somit liegt nahe, dass es bei der Opsonierung einen Synergismus zwischen Antikörpern und Komplement gibt.

5

# Beschreibung der Erfindung

len zum Inhalt hat.

10

Die Wirkung der aus dem Stand der Technik bekannten Arzneimittel zur Senkung des LDL-Cholesterins beruht auf der Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese (CSE). Als Cholesterinsynthesehemmer ist beispielsweise eine unter dem Handelsnamen Lipobay vermarktet Substanz bekannt geworden. Die Nebenwirkungen der CSE-Hemmer allgemein sind erheblich und schließen u.a. gastrointestinale Störungen, Schlafstörungen, Schwindel, Sehstörungen, allergische Reaktionen und Haarausfall ein. Lediglich im Versuchsstadium, und zwar nur bei schwerer familiärer Hypercholesterinämie, ist ein Ansatz der somatischen Gentherapie, der die Übertragung des Gens für den LDL-Rezeptor auf autologe Leberzel-

15

Ein weitgehend nebenwirkungsfreier Stoff, der als Fettsenker wirkt, ist bislang nicht auf dem Markt. Insbesondere sind Antikörper, die eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation von Lipoproteinen induzieren, bislang nicht bekannt.

25

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Generierung eines neuen Stoffes bzw. Stoffklasse zur Herstellung eines Arzneimittels zur Reduktion des LDL-Cholesterins bei Mensch und Tier mit dem vorteilhaften Ziel der Verringerung des Infarktrisikos.

Zur Lösung der Aufgabe wird ein Polypeptid vorgeschlagen, dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen mit den in SEQ ID NO: 1 und/oder SEQ ID NO: 3 angegebenen Aminosäuresequenzen identisch sind und das Polypeptid low density lipoproteins (LDL), insbesondere LDL-Cholesterin, bindet.

Der Kern der Erfindung besteht in der überraschend gemachten Beobachtung, dass ein gereinigtes Polypeptid, dessen Sequenz ganz oder teilweise der leichten (V<sub>L</sub>) oder schweren Kette (V<sub>H</sub>) eines humanen monoklonalen Antikörpers (SAM-6.10) entspricht, die Senkung des low density lipoproteins (LDL) bewirkt. Die Entdeckung dieser Eigenschaft, die den Einsatz des Polypeptids in entsprechender pharmazeutischer Formulierung als Fettsenker nahelegt, wurde im Rahmen der biochemischen Charakterisierung des Polypeptids gemacht. Vorteilhafterweise ist die Bindung des erfindungsgemäßen Polypeptids oder der Fragmente des Polypeptids an LDL und an VLDL, den Vorläufern der LDL, stärker ist als die Bindung an HDL. Aufgrund dieser Eigenschaft führt das erfindungsgemäße Polypeptid zu einem geringen Wert für den Quotienten aus LDL/HDL und minimiert somit das Infarktrisiko.

Die spezifische Bindung des Polypeptides an low density lipoproteins (LDL), bzw. LDL-Cholesterin wurde experimentell durch die ELISA-Methode nachgewiesen. Im gleichen Experiment konnte auch gezeigt werden, dass die Bindung des erfindungsgemäßen Stoffes an high density lipoproteins (HDL) schwach ist.

Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass insbesondere komplementäre Carbohydratstrukturen für die spezifische Bindung verantwortlich sind, d.h. die spezifische Erkennung der Lipoproteine durch das Polypeptid oder durch Fragmente des Polypeptids basiert auf kompli-

40

15

20

25

mentären Carbohydratstrukturen. Die Membrane eukaryotischer Zellen haben gewöhnlich einen Kohlenhydratanteil von 2 – 10 %, der von Zuckerresten der Glykolipide und Glykoproteine gestellt wird. Die Zuckerreste der Membranglykolipide und Membranglykoproteine sitzen immer auf der extrazellulären Seite der Membran. Da Zucker sehr hydrophil sind, dienen die Kohlenhydratgruppen der Glykoproteine möglicherweise dazu, die Glykoproteine in der Membran auszurichten. Von besonderer Wichtigkeit sind die Kohlenhydrate, die sehr vielfältige Strukturen ausbilden können, für die interzelluläre Erkennung.

Der erfindungsgemäße Antikörper umfasst die nach der gängigen Nomenklatur zur Beschreibung von Antikörper bezeichneten Gruppen V<sub>L</sub>,V<sub>H</sub>, Fv, Fc, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>. Die genannten Gruppen werden auch als Fragmente bezeichnet. Es ist durchaus möglich, dass ein einzelnes Fragment Ursache für die fettsenkende Wirkung des erfindungsgemäßen Polypeptids ist. In einer Weiterbildung des erfindungsgemäßen Stoffes handelt es sich um einen human monoklonalen Antikörper.

Als "funktionelles Fragment" im Sinne der Erfindung wird ein Polypeptid bezeichnet, dass zumindest eine der biologischen Aktivitäten besitzt, die auch das gesamte Polypeptid aufweist. Bei Antikörpern ist z. B. bekannt, dass für die spezifische Bindung nicht alle CDR-Regionen erforderlich sind. D.h. die spezifische Bindung des Antikörpers kann z. B. durch nur eine CD-Region bewerkstelligt werden, obwohl insgesamt 3 CD-Regionen vorhanden sind. Die spezifische Bindung des Antikörpers an ein Antigen kann z.B. zur Induktion von Apoptose oder zur Inhibition der Zellprolieferation führen. Die biologische Aktivität eines funktionellen Fragmentes kann durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Methoden, gemessen werden. Eine

10

•

15

20

25

.30

Methode zur Messung der Interaktion zwischen Antikörpern und LDL, insbesondere LDL-Cholesterin, ist die ELISA-Methode.

Die complementartity-determining regions (CDRs) der Polypeptidsequenz beinhaltet die Aminosäuresequenz, die im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäurensequenz Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1), Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) und Gln-Ala-TrpAsp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) der SEQ ID NO 1 der variablen Region der leichten Kette (V<sub>L</sub>); siehe auch Figur 2.

Die complementarity-determining regions (CDRs) der Peptidsequenz beinhalten Aminosäuresequenzen, die im wesentlichen identisch sind mit Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1), Val-IIe-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) und Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) der SEQ ID NO 3 der variablen Region leichten Kette (V<sub>H</sub>); siehe auch Figur 4.

Als "im wesentlichen identisch" wird ein Polypeptid oder eine Nukleinsäuresequenz bezeichnet, die zumindest 75 %, 80 %, 85 %, oder 90 % mit der als Referenz angegebenen Aminosäurensequenz (SEQ ID IO: 1 und 3) oder mit der Nukleinsäurensequenz (SEQ ID NO: 2 und 4) aufweist. In einer Weiterbildung des Polypeptids bzw. der Nukleinsäurensequenz sind mindestens 95 %, 98 %, 99 % oder 100 % Identität im Vergleich zu den angegebenen Referenzen nachweisbar. Für Polypeptide wird die Länge des Vergleichsabschnitts im allgemeinen mindestens 5, 10, 15 oder wünschenswerterweise mindestens 20 oder 25 aufeinander folgende Aminosäuren aufweisen.

Das erfindungsgemäße Polypeptid ist generierbar durch ein Verfahren, das unter dem Namen Hypridoma-Technik (Köhler, Millstein,

10

15

20

**25**.

Nature, 1975, Vol. 256, 495) bekannt ist und die Isolation von monoklonalen Antikörpern ermöglicht. Es beruht auf der in vitro-Gewinnung von zellulären Hybriden die durch Zellfusion von normalen Lymphozyten mit unbegrenzt lebens- und teilungsfähigen Myelomzellen (z.B. HAB-1) gewonnen werden. Die hierbei erzeugten Hybridom-Zellen weisen Eigenschaften beider Elternzellen auf. Dem entsprechend besitzen sie die Fähigkeit der Lymphozyten, Antikörper zu produzieren (z.B. SAM-6.10) und die Fähigkeit der Myelomzelle zur unbegrenzten Teilung und damit zur Produktion der Antikörper in großen Mengen. Jede aus der Fusion resultierende Hybridzelle stellt monoklonale Antikörper her deren Spezifität von der ursprünglichen Lymphozytenzelle bestimmt wird. Die Hybridomzellen werden vermehrt und dann diejenigen selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren. Die Kultivierung dieser Auswahl und deren Isolierung führt zu hochspezifisch reagierenden Antikörpern, welche nur mit einer bestimmten antigenen Determinante reagieren.

20

25

Der Nachweis der Senkung des low density lipoprotein (LDL)-Spiegels (bzw. des LDL-Cholesterin Spiegels) im Blutplasma um bis zu 95 % wurde im Tierexperiment bestätigt, ohne dass sich der HDL-Spiegel im nachweisbaren Bereich senkt. Wesentlich dabei ist, dass die Vitalfunktionen der Tiere während der Gabe des Antikörpers nicht beeinträchtigt werden, so dass die erfindungsgemäße Substanz bislang als Nebenwirkungsfrei bezeichnet werden kann. (Die Wirkungsweise des erfindungsgemäßen Antikörpers könnte sich in Analogie zum Mechanismus des bekannten Scavenger-Pathways erklären lassen.)

lypeptid zur Herstellung des Arzneimittels bevorzugt in gereinigter Form eingesetzt wird, wobei zur Reinigung sämtliche dem Fachmann bekannten Verfahren (z.B. Affinitätschromatographie, Gelfiltration) in Frage kommen. Als Indikation des erfindungsgemäßen Stoffes steht des fettsenkende Wirkung im Vordergrund, wobei insbesondere die selektive Senkung von LDL bzw. LDL-Cholesterin hervorzuheben ist. Aufgrund der Eigenschaft LDL stärker zu binden als HDL bewirkt das erfindungsgemäße Polypeptid einen geringen Wert für den Quotien-

Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass das erfindungsgemäße Po-

Die Hilfs- und Trägerstoffe zur Herstellung eines Arzneimittels sind dem Fachmann bekannt und können nach gängiger Praxis hergestellt werden (siehe Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>th</sup> ed.), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

ten aus LDL/HDL und minimiert somit das Infarktrisiko.

5

10

#### Material und Methoden

# Immortalisierung von Lymphozyten und Primärtestung der Antikörper

Zur Immortalisierung werden die Lymphozyten mit dem Heteromyelom HAB-1 (Faller et al., 1990) nach Standardprotókoll fusioniert und kultiviert. Kurz zusammengefasst, Lymphozyten werden mit HAB-1 Zellen mittels PEG verschmolzen. Die Triome werden auf vier 24-Lochplatten ausgesät. Die durchschnittliche Wachstumsfrequenz beträgt 80-90%, 50% der wachsenden Klone sezernieren Immunglobuline. Die erste Austestung der sezernierten humanen monoklonalen Antikörper erfolgt im ELISA, um den Isotyp zu ermitteln. Nachfolgend können die humanen monoklonalen Antikörper immunhistochemisch, genetisch, biochemisch und molekularbiologisch Analysiert werden.

#### Benötigte Medien:

- RPMI 1640 (Firma PAA) ohne Zusätze
   RPMI 1640 mit HAT-Zusatz (HAT-Supplement, Firma PAA) sowie
   10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin
- HAB-1 (Fusionspartner) zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen
- zentrifugieren 5 min bei 1500U/min
- eingefrorene Lymphozyten (aus Milz, Lymphknoten oder Blut)
   auftauen und zweimal mit RPMI ohne Zusätze waschen, ebenfalls zentrifugieren
- beide Pellets jeweils in 10 ml RPMI ohne Zusatz aufnehmen und in der Neubauer-Zählkammer zählen
- im Verhältnis von 1:2 1:3, Hab-1 zu Lymphozyten, fusionieren

10

15

20

25

- die Zellpellets nach dem zweiten Waschvorgang zusammen geben, mischen und 8 min bei 1500 U/Min zentrifugieren
- das zuvor bei 37°C aufgewärmte PEG (Polyethylene Glycol 1500, Firma Roche) vorsichtig tröpfelweise auf das Pellet unter leicht rotierenden Bewegungen des 50 ml Röhrchens laufen lassen
- leicht resuspendieren und dann genau 90 sek. im Wasserbad bei 37°C rotieren lassen
- danach wir das PEG mit RPMI ohne Zusätze herausrausgewaschen (zwei volle 10er Pipetten)
- zentrifugieren 5 min bei 1500 U/min
- 24 Well-Platten ausplattieren mit 1ml pro Well RPMI mit HAT-Zusatz (HAT= Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)
- das Pellet lösen in RPMI mit HAT-Zusatz
- jeweils einen halben ml der Zellen in ein 24 Well pipettieren
- Fusionsplatten in den Brutschrank stellen
- wöchentlich Mediumwechsel mit RPMI mit HAT-Zusatz

# Reinigung des Antikörpers SAM-6.10

Reinigung von Kulturüberstand durch Kationenaustauschchromatographie über FPLC

Die den IgM-Antikörper SAM-6.10 produzierenden Hybridomzellen wurden hierzu in einem speziellen serumfreien Zellkulturmedium (AIMV-Medium, Gibco) herangezogen und der Gehalt an IgM im Kulturüberstand nephelometrisch bestimmt. Zur Aufreinigung wurde der Kulturüberstand auf einen pH-Wert von auf 5,9 eingestellt und die Lösung filtriert. Zur Bindung wurde eine spezielle Kationen-Säule (HiTrap<sup>TM</sup> SP FF column, 5 ml, Amersham Bioscience) verwendet. Die Säule wurde zu Beginn der Reinigung mit filtriertem Puffer A (20 mM Phosphatpuffer, pH 5,9) äquilibriert. Anschließend wurde der auf

10

15

20

25

Eis gekühlte Kulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag des Überstandes wurde die Säule für 20 min und einer Flussrate von 2 ml/min mit Puffer A bis zu einer Basislinienkonstanz gewaschen um alle nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde der an die Säule gebundenen Antikörper durch Beimischung von Puffer B (20 mM Phosphatpuffer, 1M NaCl, pH 8,0) eluiert und in Fraktionen gesammelt. Der Gehalt an SAM-6.10 Antikörper (IgM) in den einzelnen Fraktionen wurde im Folgenden nephelometrisch bestimmt und die Reinheit und Intaktheit des gereinigten Antikörpers über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse überprüft.

Tierexperimente zum Nachweis der *in-vivo* Wirkung des Antikörpers SAM.10

Experiment 1: 500µg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurden intra peritoneal injiziert. Die LDL Konzentration im Blutserum wurde nach 2 Tagen gemessen (Methode siehe unten).

Experiment 2: wie oben

Experiment 3: 1mg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurden intrapereitoneal injiziert. Die LDL Konzentration im Blutserum wurde nach 14 Tagen gemessen.

Kontrolle A: Normalwerte Kontrollmaus Kontrolle B: Normalwerte Kontrollmaus

Die Serumkonzentration von LDL ist bei den mit SAM-6.10 behandelten Mäusen bis zu 95% reduziert (siehe Figur 5).

10

15

20

25

#### **Toxizität**

500µg bzw. 1mg gereinigter SAM-6.10 Antikörper wurde Mäusen intraperitoneal injiziert.

- keine akute Toxizität
- keine latente Toxizität (Zeitraum 3 Monate).

Die Organe der getöteten Mäuse aus Experiment 1, 2 und 3 (siehe oben) wurden entnommen und untersucht: Leber, Lunge, Herz, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Nieren, Magen und Gehirn wiesen keine morphologischen Veränderungen auf. Darüber hinaus wurden die Organe immunhistochemisch auf eventuelle Lipideinlagerungen untersucht. Die Färbung mit Sudan III zeigte in keinem Organ eine Einlagerung von Lipiden.

Die Organe der getöteten Mäuse wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Färbung erfolgte mit dem Farbstoff Sudan III nach folgendem Protokoll:

#### Sudan III-Färbung auf Parafffinschnitten

Entparaffinierung:

- Xylol 1 5 min
- Xylol 2 5 min
- 100% Ethanol 1 5 min
- 100% Ethanol 2 5 min
- Methanol 70ml
  - + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500µl 5 min
- 90% Ethanol 1 3 min
- 90% Ethanol 2 3 min
- 80% Ethanol 1 3 min
- 80% Ethanol 2 3min
- 70% Ethanol 1 3 min
- 70% Ethanol 2 3 min
- Schnitte in PBS stellen
  - Schnitte 15 min mit Sudan III inkubieren

15

20

25

30

- waschen mit Aqua dest.
- 1 x in 60% Isopropanol eintauchen
- waschen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Hämalaun für 6 min
- Schnitte 10 min wässern, waschen mit Aqua dest und mit Glyceringelatine eindeckeln

# Bestimmung von Lipiden in Blutproben

Die Messung der verschiedenen Lipide im Blutserum wurde automatisch mit dem MODULAR D P800 Gerät (Roche) vorgenommen. Die Bestimmung des LDL-Cholesterinwertes erfolgte durch eine enzymatische, kolorimetrische Methode (CHOD/PAP) ohne Probenvorbehandlung.

## Testprinzip:

HDL, VLDL und Chylomikronen werden von einem Detergenz 1 spezifisch hydrolysiert. Das in diesen Lipoproteinen freigesetzte Cholesterin reagiert sofort durch die enzymatische Wirkung der Cholesterinesterase (CE) und Cholesterinoxidase (CHOD) und es entsteht Wasserstoffperoxid. Dies bildet mit 4-Aminoantipyridin in Anwesenheit einer Peroxidase (POD) ein farbloses Produkt. Während dieses Schrittes bleiben die LDL-Partikel intakt. Die Reaktion von LDL-Cholesterin wird durch Zugabe von Detergenz 2 und der Kupplungssubstanz N,N-bis(4-Sulfobutyl)-m-toluidin (DSBmT) ausgelöst. Das zweite etergenz setzt Cholesterin in den LDL-Partikeln frei. In der enzymatischen Reaktion wird in Anwesenheit der Kupplungssubstanz ein Farbstoff gebildet. Die Intensität des gebildeten roten Chinoniminfarbstoffs ist direkt proportional zur LDL-Cholesterin-Konzentration. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 552 nm bestimmt.

10

٠.

15

20

25

# ELISA (LDL/HDL)

- ELISA-Platte vorbeschichten mit LDL (Lipoprotein Low Densi tyfrom Human Plasma, Firma Sigma, 10μg/ml in PBS) oder HDL (Human HDL, Firma Chemicon ,10μg/ml in PBS) → 50 μl pro well
- Platte abdecken und über Nacht bei 4°C lagern
- am nächsten Tag Platte 2 x mit PBS waschen
- 100 μl RPMI in jedes well pipettieren. und für 1h bei RT inkubieren
- danach 2 x mit PBS waschen
- ` 50 µl der jeweiligen Positivkontrollen in je 2 wells pipettieren (Doppelbestimmung)

Positivkontrolle: Mab to human LDL Mouse IgG2a 1:1000 in PBS

- daneben 50 μl RPMI als Negativkontrolle (Doppelbestimmung)
- 50 μl der Proben (Überstand SAM6.10) (Doppelbestimmung) nebeneinander pipettieren
- 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 50 μl der jeweiligen 2. AK (Peroxidase konjugiert.) pipettieren: rabbit anti human IgM 1:1000 in PBS/0,05%Tween (für SAM-6.10)
  rabbit anti Mouse IgGs 1:1000 mit PBS Tween (für Positivkon-
- 1h im Brutschrank inkubieren
- 2 x mit PBS waschen

trolle LDL)

- 1 x mit PBS/0,05% Tween waschen
- 2 x mit PBS waschen
- 2 x mit Citratpuffer waschen

10

15

20

- zum Auswerten: OPD Tablette (Dako, Hamburg) in Citratpuffer lösen + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 ml Citratpuffer + eine Tabl. + 5 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- 50 μl Farbstoff in jedes Well pipettieren
- bei positiver Reaktion (gelbe Färbung) mit 10 μl 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppen

# Erläuterung der Figuren

Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO 1) der variablen Region der leichten Kette (V<sub>L</sub>).

Figur 2 zeigt die Nucleotidsäuresequenz (SEQ ID NO 2) der variablen Region der leichten Kette (V<sub>L</sub>). Die complementarity-determining regions (CDR) sind durch Querstriche gekennzeichnet und im wesentlichen identisch mit den Nucleotiden 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) und 262-288 (CDR3) von SEQ ID NO 2.

Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO 3) der variablen Region der schweren Kette (V<sub>H</sub>).

Figur 4 zeigt die Nucleotidsäuresequenz (SEQ ID NO 4) der variablen Region der schweren Kette (V<sub>H</sub>). Die complementaritydetermining regions (CDR) sind durch Querstriche gekennzeichnet und im wesentlichen identisch mit den Nucleotiden 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) und 295-330 (CDR3) von SEQ ID NO 4.

Figur 5 dient zum Nachweis der Wirkung des erfindungsgemäßen Stoffs. Figur 5 soll jedoch nur zur Erläuterung und nicht zur Einschränkung der Erfindung dienen. Figur 5 zeigt die *in vivo* Wirkung von SAM-6.10. Im beschriebenen Tierexperiment mit Mäusen kommt es zu einer Reduktion der Serumkonzentration von LDL nach SAM-6.10 Behandlung um bis zu 95 %.

10

15

20

25

## <u>Patentansprüche</u>

5

1. Gereinigtes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, dass

 die Aminosäuresequenz des Polypeptids im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3, und

- das Polypeptid low density lipoproteins (LDL), insbesondere LDL-Cholesterin, bindet.

10

2. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung des Polypeptides oder der Fragmente des Polypeptids an low density lipoproteins (LDL) und very low density lipoproteins (VLDL) stärker ist als die Bindung an high density lipoproteins (HDL).

15

3. Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid oder Fragmente des Polypeptids und die im menschlichen und tierischen Körper vorkommenden low density lipoproteins (LDL) komplementäre Carbohydrat-Strukturen aufweisen.

20

4. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ein Antikörper oder ein funktionelles Fragment davon ist.

2

5. Gereinigtes Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ein funktionelles Fragment einer der nachfolgend genannten Gruppen von V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, F<sub>V</sub>, F<sub>C</sub>, Fab, Fab', und F(ab')<sub>2</sub> ist.

- 6. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz der variablen Region der leichten Kette (V<sub>L</sub>) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 1 und/oder die Aminosäuresequenz der variablen Region der schweren Kette (V<sub>H</sub>) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 3.
- 7. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäuresequenz der variablen Region der leichten Kette (V<sub>L</sub>) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 2 und/oder die Nucleinsäuresequenz der variablen Region der schweren Kette (V<sub>H</sub>) im wesentlichen identisch ist mit SEQ ID NO 4.
- 8. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten Fragmente ein Fragment der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO 1 oder der SEQ ID NO 3 beinhalten.
- 9. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten Fragmente ein Sequenzfragment
  enthalten, das im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3.
- 10. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid im wesentlichen identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO 1.

10

15

20

) E

12. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid Nucleinsäuresequenzen beinhaltet, die im wesentlichen identisch sind mit den Nucleotiden 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) und 262-288 (CDR3) of SEQ ID NO 2.

10

13. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid Nucleinsäuresequenzen beinhaltet, die im wesentlichen identisch sind mit den Nucleotiden 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) and 295-330 (CDR3) of SEQ ID NO 4.

15

14. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid von einer hinterlegten Hybridomzelllinie, die am 7. November 2003 mit der Bezeichnung "SAM 6.10" bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) hinterlegt wurde, exprimiert wird.

20

15. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 beinhaltet.

25

16. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3 beinhaltet.

30

17. Gereinigtes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:1 und/oder SEQ ID NO:3 beinhaltet.

- 19. Complementarity-determining regions (CDR) oder funktionelle Fragmente davon, welche die Aminosäuresequenzen Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1) oder Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) oder Gln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) of SEQ ID NO: 1 und/oder Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1) oder Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) oder Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) SEQ ID NO: 3.
- 20. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid nach dem in Anspruch 21 beanspruchten Verfahren generierbar ist.
- 21. Verfahren zur Generierung eine Antikörpers nach der Hybridomtechnik, dadurch gekennzeichnet, dass die Hybridom-Zellen
  durch Fusion der Heteromyelom-Zellen HAB-1 sowie deren Subklone mit B-Lymphozyten gewonnen werden, welche aus humanen Milzen, Lymphknoten oder Blut entnommen sind.
- 22. Gereinigtes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 und 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ein monoklonaler Antikörper ist.

15

20

25

- 23. Gereinigtes Polypeptid nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ein humaner monoklonaler Antikörper ist.
- 24. Verwendung eines Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche in Kombination mit üblichen Hilfs- und/oder Träger-stoffen zur Herstellung eines Arzneimittels mit fettsenkender Wirkung.
  - 25. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung von low density lipoproteins (LDL) im Blut.
  - 26. Verwendung des Polypeptids nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur Senkung von LDL-Cholesterin.

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink,	Hans Konrad
Prof. Dr. Vollmers, H. Peter	

<120> Humaner monoklonaler Antikörper

<160>4

<210>1

<211>96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<223> Aminosäure-Sequenz der variablen Region der leichten Immunglobulinkette (V<sub>L</sub>) des Antikörpers SAM-6.10

<400>1 ·

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly
1 10 15

Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys
20 25 30

Tyr Ala Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu
35 40 45

Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser 65 70 75.

Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp
80 85 90

Asp Ser Ser Ile Val Val

# Figur 1

				•												•		•			
	•	<21	0>2	2	•		·	.*	•		·						:	•	•	•	• •
	•	<21	1>2	288	_	•		•		•	,		:			•	_	•	• :		•
•	•	<21	2>1	DNA		,	•	•			•			•				- •			
·				Hom		Niens								ī	•		•	•		•	•
•		<b>~</b> ∠	ر حرب	10111	o sar	, Your	•	•		•				•		•		٠.	•••		•
		·		XT1_1	۱ _ ـ 4	·. I G			•	1 1		•		•	_						
•	•	· <b>~</b> 22	.3~ I	NUKI	eoud	i-Seg	uen	z der	vari	ablei	n Ke	gion	der l	eich	ten I	mmu	mgl	obul	inkette	$e(V_L)$	) des
•	• •			Antil	körpe	ers S	AM.	-6.10		• •	•	•	•		•					.*	
		<40	0> 2	<u>.</u>	•	•		•		•	: :			·	•		•			•	•
•	•		<b>.</b>	-4-		,			•	•			•	_		•	•				•
• '		Ser	Tur	gtg Val	CTG	.act	cag	CCA	CCC	tca	gtg	tcc	gtg	tcc	cca	gga			45	,	
· ' .		1	- y -			5	ATII	ָר דַּיָּט	, 110	Der	.10	Ser	vaı	ser	PIO	6±y	•	•			
	• . •	•	•	. •	•				•	•					•	1.0		•	•		
		•	•	•	• .	. •		•	·					CDR				• •		•	
•		cag	aca	gcc	agc	atc	acc	tgc	tct	gga	gat	aaa	ttg	.ggg	gat	aaa			90		
	a ,	· eru	rnr	Ala	ser	. 20.	_	Cys	Ser	GIY		Lys	,Leu	Gly	Asp	_	•	•	٠		
		•				~ 20.	•	•	•		25					30					•
			•		.*					•								• .	•	. ,	
1		tat	gct	tgc	tgg	tat	cag	cag	aag	cca	ggc	cag	tcc	cct	gtg	ctg		•	135	i .	•
		Tyr	Ala	Cys	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leụ		•		•	• .
			:			35		•		` .	4.0					4.5	`.	•	• •		•
						•	. (	DR2			•	·					- 1	. 1	•		•
		gtc	atc	tat	çaa	gat	agc	aaq	cqq	CCC	tca	aaa	atc	cct	σασ	cσa-		• •	180	•	
•	.:			Tyr														٠	70.0	•	•
. <b>•</b>	<i>:</i>	•		_		50			•		55	-		••		60,				•	
• • •			•	•						•					•			•		•	
7.	. •	ttc	tct	ggc.	tcc	aac	tet	άαα	220	. 202	acc	a'cit	cta	200	2+0	200		•	225	•	•
• .				Gly														•	225	•	•
		•		•		65		, ,			70	•	:			75		• • •			
•		• .		,		•	-		•••	,	• .		•	• '	•					•	
•	•		,					•		•			•	<u>*.</u>				•	•		.•
••	•			cag													•	•	270	•	•
•		OTA	1111	Gln		80	АЗР	GTU	MI a	HSD	R5	TYE	Cys	GTII	АТА	30.			3		•
•			•		•			-	-		. ,		4							,	
		<del></del>		CDR	3	- 		•			•	•				•		•		•	
	}•			agc,			_			-				•	•				288	•	
		Asp.	ser	Ser	Ile	Val	Val					•		•							•

<210> 3
<211> 110
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<223> Aminosäure-Sequenz der variablen Region der schweren Immunglobulinkette (V<sub>H</sub>) des Antikörpers SAM-6.10

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
1 5 10 i 15

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser 20 25 30

Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr 50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser 65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp 80 85 ', 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Ala Val Ala Gly 95 100 105

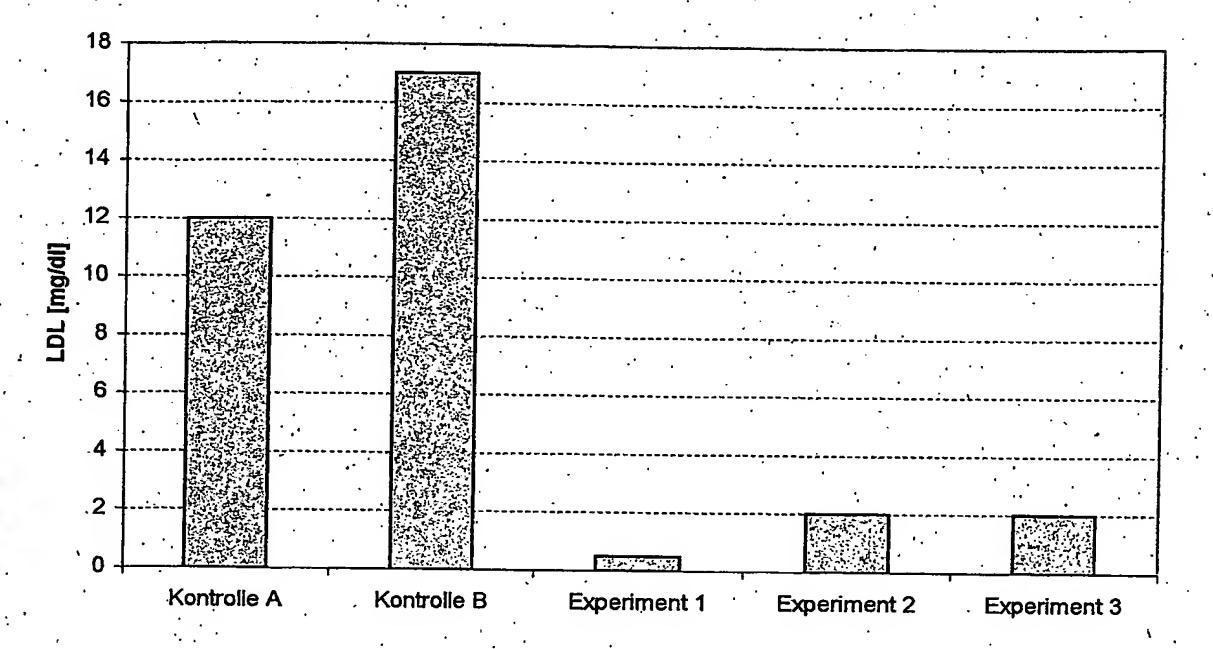
Lys Thr Phe Asp Tyr



	4
_	>
	ė

	<2	10>	4		•		•	. •	•	•	1	,		•	· . ·		•	•	•	٠,	••
•			<b>330</b> .		:	•	•		•	•		• .									•
			DNA			•	•	•	•				•				•	•	, •		• •
·	<2	13>	Hon	io sa	pien	S	•										. •			•	
• •	•	_ 1			•		•			•	•				•	•					٠.
•	<2:	23>.	Nuk	leoti	d-Se	quen	z de	r var	iable	n Re	egior	der	schv	verer	ı Imn	nun	gloł	oulink	ette	·(Vu	J d
	•		Anti	körp	ers S	SAM	[-6.1	0		•		•	•			•	<b>Θ</b> - • •				, u
•	· , , , ,	00>		:	٠.	•						,	•		•			1			
	741	, <b>~U</b> U	4	•.	•					•		•	:		•	•	٠.		•		
•	caq	ato	r cac	r ata	r ata	r crac	· ·	· .	7 ~~~	. ~~~				•	ggg		•	• .	•		•
.· · ·	Gln	. Val	Glr	Lei	1 Va	. Gli	ı Sei	r Gly	y gga / Gl	. 990 / Glv	, grç , Va]	gto Val	cag Glr	J CCt	Gly ggg	•		45	<b>5</b>	•	
	. 1		•		5	•	• . •			.10	)			,	15			• •	•		
;	· ·	•	. •		•	•			•.		• .						•	•	,		
•	agg	tcc	ctg	aga	cto	tcc	: tgt	: ·gca	gcc	: tct	gga	ttc	: acc	: ttc	agt		•	90		• .	
	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gĺy	Phe	Thr	Phe	Ser			90	•	•	
	•				. 20	• •				25	•				30			• -			•
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	DR1	•		-								. •		. •		•		•	
	agc	tat	gct	atg	cac	tgg	gto	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	•	•	135		•	
	26T	туг	Ата	Mer	. His -35	rrp	.Val	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		• • .	•			
				•	<b>55</b> .	••.			÷-		•	••			45		•	•.	•		•
•	asa	+~~	يما طويم							R2	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	·	•	- <u> </u>	•						
•	Glu	Trp	Val	Ala	Val	ata Ile	tca Ser	Tat Tvr	gat	gga Glv	agc	aat	aaa	tac Tyr	tac	,	•	180	·		
•	•	_	•	:	50			-2-	, LOD	55	De'r'	, Voli	цуѕ	TAL	19£	,	•				
•				•	• •	•					•	•		•	-	•	•				
· •	gca	gac	tcc	gtg	.aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	toc	aga	ma.c	aat	t co				•	•	
	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	•	4	225	•		
	•		•		. 65	•				70	•				.75 ·						
	•		. •		- ,								•				•	•		• .	•
•	aag	aac	acg	ctģ	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gct	gag	gac		•	· 270		•	•
	гуу	Asn	Tar	Leu	Tyr 80	Leu	Gln	Met	Așn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	•				•	
				. ,		•		•		63	,			•	90					•	
				"···		•	•				CDR:		, 			•			•		•
	acg Thr	gct. Ala	gtg . Val	tat Tur	Tur	tgt	gcg	aga	gat	cgg	tta	gca	gtg	gct.	ggt			315			•
	•		,	~ 1 ~	95	· ·	IJT.Q	T.A	uah	100	теп	· TS	vaı	Ala ·1	Gly 05	•	•	· ·	•		•
1		•		•			•	•	•		•			, +	.50		-	•	•		,
•			•	• •				•	•						_		•	•			
i.	aaa	act	<del></del>	<u></u>	+					• •	•	••	-		•			•			

Figur 4



Figur 5



# This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS
IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
FADED TEXT OR DRAWING
BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
SKEWED/SLANTED IMAGES
☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
GRAY SCALE DOCUMENTS
LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
OTHED.

# IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.